

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02768

研究課題名(和文)塩基配列選択的なDNA二重らせん結合性フォトンアップコンバージョン蛍光プローブ

研究課題名(英文) Photon Upconversion Fluorescent Probe for Sequence Selective Detection/Imagine of Double-Stranded DNA

研究代表者

中野 幸二 (Nakano, Koji)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：10180324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：三重項・三重項消滅による蛍光発光、フォトン・アップコンバージョンによる新しい蛍光プローブを開発した。具体的には、ゲノムDNAのアンドロゲン応答配列(ARE)の蛍光分析のために、ARE結合性ピロール-イミダゾールポリアミドにPt-コプロポルフィリン(PtCP)とアントラセン(ANTH)を組み込んだ新規化合物を合成した。研究期間の前半で合成ルートが確立できたので、後半ではAREフラグメントに対する結合挙動を評価し、レーザー励起蛍光分光器を用いてスペクトルを測定した。その結果、PtCPを励起(533nm)することでPtCPのリン光(650nm)だけでなくANTHからの蛍光(480nm)が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基本的な励起一重項からの発光をはじめ蛍光共鳴エネルギー移動、遅延発光を利用する方法など、蛍光プローブは細胞のin vivo観察で成果を収めてきた。しかし、可視領域の蛍光イメージを得るためには強力な紫外光励起が必要で、細胞は深刻なダメージを受けてしまう。このような状況のもと、低損傷な長波長の可視光で励起でき、より短波長側で蛍光を示すDNA結合性蛍光プローブを開発した。これは世界で初めての例であり学術的な意義は大きい。また、二光子励起蛍光法のように取扱いが難しく、大掛かりで高価な装置は必要ないので、実用化の後には、ベンチトップ観察法として細胞研究や医療診断に貢献できる点で社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We report a new fluorescent probe that utilizes triplet-triplet annihilation-based photon upconversion. In particular, for analyses of the androgen-responsive sequence (ARE) in genomic DNA, we designed a type of ARE-binding pyrrole-imidazole polyamides incorporating Pt-coproporphyrin (PtCP) and anthracene (ANTH). We successfully developed a practical synthetic route in the first half of the research period. Subsequently, we studied the binding behavior to the ARE fragment and measured the fluorescence spectra for the ARE-DNA probe using a laser excitation fluorescence spectrophotometer. At last, we found that when the PtCP in the molecule was excited with excitation light at 533 nm, the molecule gave the phosphorescence of PtCP (650 nm) and the fluorescence from ANTH (480 nm). Therefore we concluded that, for the first time, we successfully developed a photon upconversion probe for DNA analyses.

研究分野：分析化学

キーワード：蛍光プローブ フォトンアップコンバージョン 二重鎖DNA 分子イメージング エピジェネティック

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現に興味を持たれている(エピジェネティック制御)。そのためには『ゲノム DNA に含まれる特定の塩基配列や特異な立体構造を in vivo イメージングして分析する方法』が必要である。このようなアプリケーションは蛍光分析法の独占場とあって良く、さまざまな機能性分子(蛍光プローブ)が研究されてきた。しかし、可視領域の蛍光画像を十分な S/N 比のもとで取得するためには、強力な紫外光を照射して励起する必要がある。当然ながら、このとき生細胞は深刻なダメージを受けてしまう。この影響を低減できる方法として、近赤外光を利用した 2 光子励起蛍光法が期待されているが、2 種類の光子に対する独立した光吸収を同期して励起することは難しく、併せて通常法とは比較にならないほど装置コストが嵩んでしまう。

(2) ある種の蛍光分子は、励起一重項から、項間交差を経て三重項に変わったのち発光する(リン光)。このとき、励起エネルギーを受け取るアクセプターが存在すると、三重項がドナーとなってアクセプター分子を励起し、アクセプターの蛍光が観察されるようになる(三重項-三重項励起子消滅)。いわゆるフォトン・アップコンバージョン(UC)である。UC 発光が可能な色素は、有機 EL や太陽電池における光機能材料として研究されており、バイオイメージングに利用された例はない。しかし、蛍光プローブに UC 機構を組み込めば、長波長の可視光で励起したとしても短波長側に蛍光を示すので、細胞へのダメージを低減しつつ可視光領域の画像を取得する可視化分析アプリケーションが実現できる。

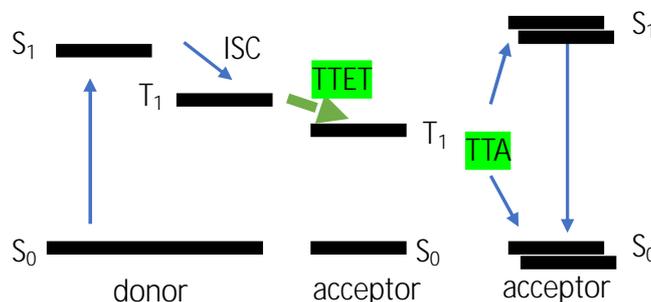


図1 三重項-三重項励起子消滅によるフォトン・アップコンバージョン過程。S₀ 基底状態, S₁ 励起一重項状態, ISC 項間交差, T₁ 三重項状態, TTET 三重項エネルギー移動, TTA 三重項-三重項励起子消滅。

2. 研究の目的

(1) 生細胞の蛍光イメージングでは、1) 細胞に含まれる生体分子が蛍光プローブと同時に励起されることによる発光(自家蛍光) 2) 余剰の蛍光プローブからのバックグラウンド発光も障害となる。いずれも、2 種類の蛍光分子を用意して、分子間で共鳴蛍光エネルギー移動を起こして発光するように工夫することで解消できている。しかし、通常の蛍光法に変わらぬので、励起光による細胞ダメージは避けられない問題として残されている。したがってこれを解消した蛍光プローブ、あるいは蛍光画像の取得方法の確立が強く望まれている。

(2) 遺伝子研究の早い段階で、放射性核種や蛍光性置換基で修飾した化学合成 DNA が提案され、相補的な一本鎖 DNA を認識して結合する現象(ハイブリダイゼーション)を利用したパイオ分析の成果を挙げてきた。しかしエピジェネティック研究では、細胞核内に保存されているゲノム DNA が対象になる。従来の DNA プローブ分析では、ゲノム DNA を変性させて一本鎖にしなければならず、およそ現実的ではない。そこで、DNA に特異的に結合するタンパク質の一群(転写因子)を模倣して、DNA の溝に結合する小分子やペプチド類が研究されてきた。ピロール Py とイミダゾール Im をアミド結合で連結した分子(ピロール-イミダゾールポリアミド PIPA)はその一例である。PIPA の特徴は、Py と Im の配列を適宜変えることで DNA の塩基対選択性を調節できる点である。加えて主鎖がアミド構造なので生分解性が低く、細胞への送達性にも優れている。

3. 研究の方法

(1) 我々は、分子量数千におよぶペプチドを合成して、単一分子の分析試薬として利用する研究を行ってきた。これまで、天然のマイクロペルオキシダーゼと同等の完全合成品、ペプチド核酸(PNA)と酵素をワンポット合成したペプチド核酸酵素-PNAzymeなどを報告してきた。これらの成果を活かし、PIPA に UC 色素を組み込んだ新発想の蛍光プローブ(UC プローブ)を合成する。PIPA は、主鎖中心のリンカー部位のコンホメーションに依存して、開いた直鎖状(Open 構造)と中心から折り畳まれて主鎖がバンドルした構造(Turn 構造)の 2 種類の立体構造をと

る。DNA に結合するのは Turn 構造だけなので、色素の配置を工夫して TTA を OFF-ON 制御出来る方法、すなわち DNA への結合に依存した UC 発光を実現する。

(2) 化学合成オリゴヌクレオチドやプラスミド DNA をモデルにした均一系での実験により、UC プロブの DNA 結合性を評価する。同様にして UC 発光を調べ、最適の発光が得られる条件を明らかにして、ターゲット DNA の UC 蛍光分析法を確立する。UC 発光が得られないか、あるいは強度が十分でない場合には、UC 色素結合部位をある程度スクリーニングして、分子構造を最適化した新しい UC プロブを合成する。これらの検討を通じて、研究の最終段階では培養細胞に送達した遺伝子の UC イメージングを試みる。

4. 研究成果

(1) アクセプター修飾 ARE 結合性 PIPA の合成 (図 2 B)

アンドロゲン(AR)は、前立腺癌のホルモン依存性を引き起こすタンパク質である。ゲノム DNA に含まれるアンドロゲン応答配列 (ARE) に結合すると、下流にある前立腺特異抗原の転写を促進して疾病を誘起する作用機序が提案されている。すでに ARE 結合性 PIPA も報告されているが、ここでは、UC アクセプターとなるアントラセンによる化学修飾を試みた (A-PIPA)。種々検討したなかで、固相ペプチド合成サイクルにアントリルアラニンを組み入れることで、カルボキシ末端をアクセプターで修飾した A-PIPA を収率良く合成することができた。なおこのとき、ドナーからのエネルギー移動の確率を高めるために、ANTH の組み込みは 2 回連続して行なった。なお次の段階でのドナー分子導入も想定し、アミノ末端には、反応活性な残基を持つリシンを導入している。

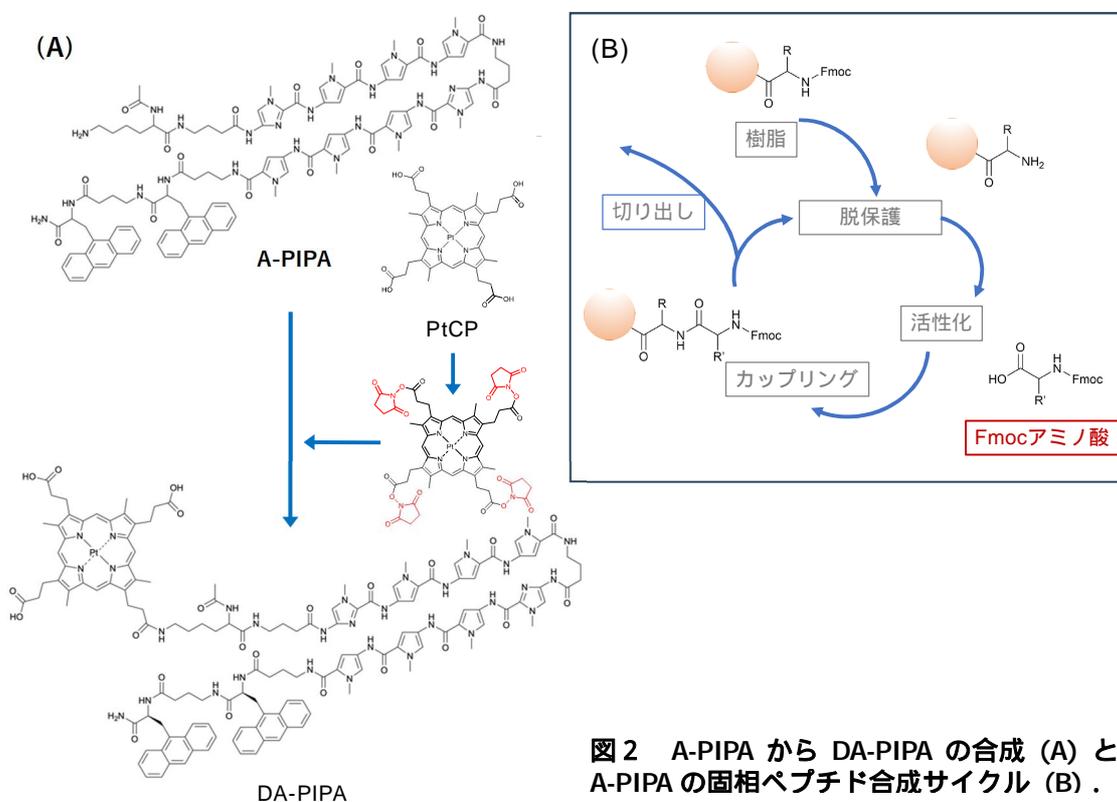


図 2 A-PIPA から DA-PIPA の合成 (A) と A-PIPA の固相ペプチド合成サイクル (B)。

(2) ARE 結合性 A-PIPA と DNA との結合評価

ARE 配列を持つ 12 量体化学合成オリゴヌクレオチド (ARE-DNA) について、波長 260 nm における核酸塩基の吸光度の温度依存性から、二重鎖オリゴヌクレオチドが一本鎖に解離する温度 (融点) を測定した。その結果、A-PIPA が共存すると、DNA 単体よりも融点が上昇した。アクセプターを持たない ARE 結合性 PIPA でも同じ効果が報告されており、PIPA が二重鎖に結合することで安定化しているためと説明されている。この結果より、A-PIPA も ARE 結合性を持つことが確認できた。

(3) ドナー修飾 ARE 結合性 A-PIPA の合成 (図 2 A)

UC 発光を担うドナーには、ポルフィリンの重元素錯体を組み合わせる例が多い。ここでは白金-コプロポルフィリン錯体 (PtCP) を選び、コプロポルフィリンのプロピオン酸基を A-PIPA のアミノ末端のリシン残基と反応させる方法を考案した。種々検討した結果、プロピオン酸基をあらかじめ活性エステル体に誘導すると、温和な条件下で所定の DA-PIPA を合成できることが分かった。しかし、原料の PtCP が高価であり少量しか使用できなかったため、ごく限られた量の DA-PIPA を得るに止まった。そのため、大量の DA-PIPA が必要な ARE 結合実験は行えていない。

(4) ARE 結合性 DA-PIPA の UC 発光 (図3)

分散型蛍光分光光度計を用いて、ARE 配列を持つ 12 量体化学合成オリゴヌクレオチド (ARE-DNA) の共存下で DA-PIPA の蛍光スペクトルを測定した。その結果、DA-PIPA のドナーである PtCP の Q 帯を励起すると (λ_{ex} 533 nm)、650 nm に PtCP のリン光が観察された。ARE-DNA が共存すると、PtCP のリン光の強度が低下し、逆に 450 nm 付近に新たな発光が生じることが分かった。これは、文献に見られる Pt-ポルフィリン錯体 - アントラセン系での発光挙動と一致したので、本研究で新たに合成した DA-PIPA が UC 発光を示すことが確認できた。しかし、装置の迷光の影響のためかやや定量性に欠ける結果に止まった。また、励起光の強度が低いため、十分な強度の発光を得ることも難しく、これらの点の改善が必要と思われた。

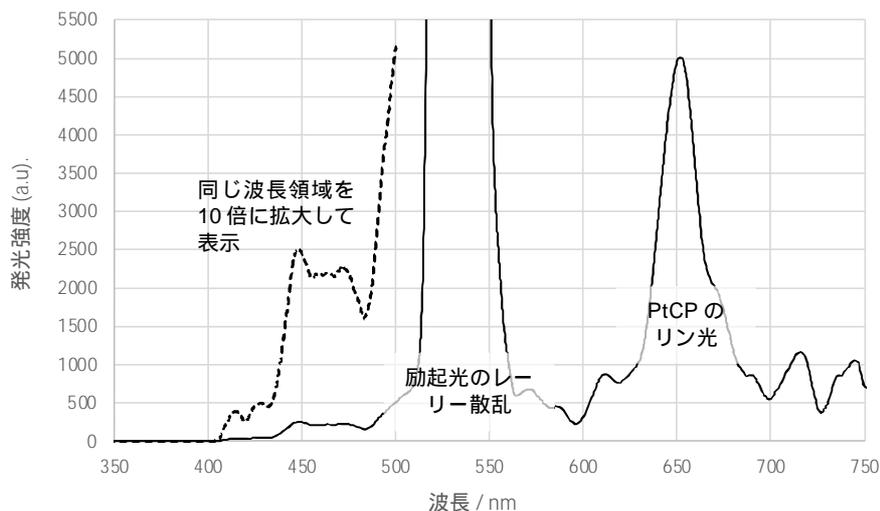
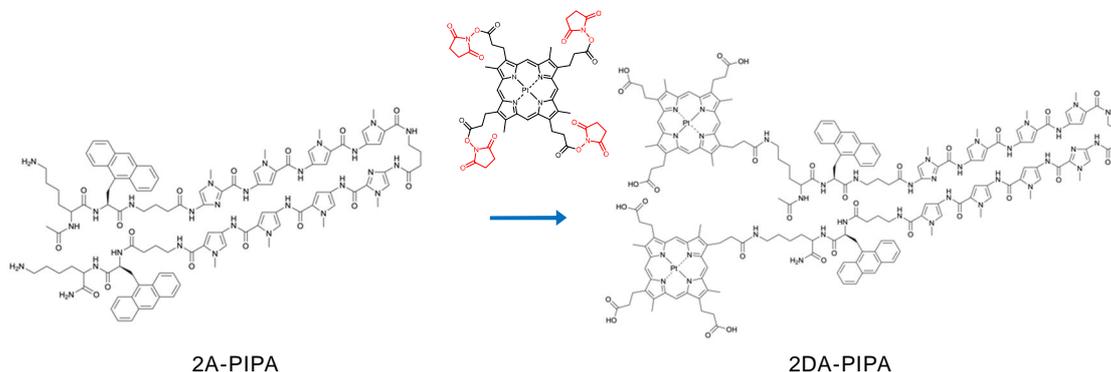


図3 DA-PIPA の UC 発光スペクトル . 資料溶液は 10 mM DA-PIPA, 10 mM ARE-DNA を含むリン酸緩衝溶液 .

(5) 二重化 UC プローブの合成とレーザー励起 UC 蛍光測定

前項で問題となった、1) UC 発光の強化、2) 分光分析装置の改良の 2 点に取り組んだ。まず発光強度を強化するためには UC 効率の改善が重要であると考えられるので、これまでの 1 組の DA ペアに加えてもう 1 組の DA ペアを組み込んだ二重化 UC プローブ (2DA-PIPA) に取り組んだ。これまでの研究の蓄積が奏功し、大きな試行錯誤なしに新しい UC プローブを合成することに成功した。本研究により、PIPA ベースの UC プローブの合成の基本戦略が確立出来たと言っても過言ではない。次に、励起光源に半導体レーザーを使い、分光検出器のモノクロメーターとフォトマルの組み合わせをフォトダイオードアレイで代用したレーザー蛍光分光光度計を組み立てて、後者の問題点の改善に取り組んだ。その結果、蛍光測定の再現性が向上し、2DA-PIPA がその濃度に依存した強度の UC 発光を示すことが確認できた。ただし、UC 発光の強度は依然として十分ではなかった。一般の UC 蛍光実験では、大過剰のアクセプターを用いるケースが多いので、本系でもそのような条件設定が必要かもしれない。また、ARE-DNA が共存しても明確な違いを示さず、UC 発光の OFF/ON 制御も現段階では出来ていない。今後、これらの点の改善が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okada Koji, Ishimatsu Ryoichi, Mizuno Jun, Kasahara Takashi	4. 巻 334
2. 論文標題 Microfluidic electrogenerated chemiluminescence cells using aluminum-doped zinc oxide nanoparticles as an electron injection layer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators A: Physical	6. 最初と最後の頁 113329 ~ 113329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sna.2021.113329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakakubo Keisuke, Yoshioka Hiroaki, Morita Kinichi, Ishimatsu Ryoichi, Kiani Abolfazl, Hallen Hans, Dickey Michael D., Oki Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Dynamic control of reflective/diffusive optical surfaces on EGaIn liquid metal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optical Materials Express	6. 最初と最後の頁 2099 ~ 2099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OME.425432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koinuma Yugo, Ishimatsu Ryoichi, Kato Emiri, Mizuno Jun, Kasahara Takashi	4. 巻 127
2. 論文標題 Green electrogenerated chemiluminescence using a quinacridone derivative as a guest molecule	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electrochemistry Communications	6. 最初と最後の頁 107047 ~ 107047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.elecom.2021.107047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakano Koji, Sawada Takafumi, Mori Yoshifumi, Morita Kohei, Ishimatsu Ryoichi	4. 巻 36
2. 論文標題 Covalent Hyperbranched Polymer Self-Assemblies of Three-Way Junction DNA for Single-Molecule Devices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 10166 ~ 10174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c01621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishimatsu Ryoichi, Shimizu Shinichi, Hongsibsong Surat, Nakano Koji, Malasuk Chacriya, Oki Yuji, Morita Kinichi	4. 巻 218
2. 論文標題 Enzyme-linked immunosorbent assay based on light absorption of enzymatically generated aniline oligomer: Flow injection analysis for 3-phenoxybenzoic acid with anti-3-phenoxybenzoic acid monoclonal antibody	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 121102 ~ 121102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2020.121102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda Naoki, Okabe Hirotsuka, Nagamura Toshihiko, Nakano Koji	4. 巻 94
2. 論文標題 Direct Electron Transfer Reaction of Cytochrome c Immobilized on a Bare ITO Electrode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 433 ~ 439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中野幸二, 木下美里, 姫野俊基, 石松亮一
2. 発表標題 マイクロペルオキシダーゼ/バニロイドレセプターハイブリッド15量体ペプチド酵素の化学合成とペルオキシダーゼ反応の基礎検討
3. 学会等名 第81回分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 諒祐, 中野 幸二, 石松 亮一
2. 発表標題 ペプチド核酸/タンパク質酵素ハイブリット分子-PNAzymeの合成とバイオ分析への応用
3. 学会等名 日本分析化学会第70回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石松 亮一, 中野 幸二
2. 発表標題 分光電気化学測定法によるピレンのラジカルアニオンダイマーの検出
3. 学会等名 日本分析化学会第70回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Nakano, J. Tanabe, Y. Sezaki, R. Kobayashi, R. Ishimatsu
2. 発表標題 PNAzyme: Monolithic peptide nucleic acid peptide sequence hybrid functioning as molecular recognition catalyst element for nucleic acids analysis
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野幸二, 田邊潤壱, 石松亮一
2. 発表標題 ペルオキシダーゼ活性を持つペプチド核酸モノリスハイブリッド-PNAzymeの合成と遺伝子センシング応用
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石松亮一, 清水慎一, 中野幸二
2. 発表標題 ピレスロイド系殺虫剤の体内代謝物である3-phenoxybenzoic acid検出に向けたフローインジェクションELISA法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院工学研究院応用化学部門 化学環境工学講座 研究紹介
<http://www.cstf.kyushu-u.ac.jp/~chemenvironlab/detail.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石松 亮一 (Ishimatsu Ryoichi) (90512781)	九州大学・工学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------